

TOLÉRANCE DE LA FAUNE MARINE A *BACILLUS THURINGIENSIS*

par Claude ALZIEU, Huguette de BARJAC (1) et Pierre MAGGI

— Le patrimoine forestier est régulièrement menacé par la prolifération de prédateurs qui, par leur voracité, peuvent dévaster de très importantes surfaces boisées. Parmi ces ravageurs, la chenille processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa* SCHIFF) fait l'objet d'une surveillance particulière des services phytosanitaires chargés de la protection des végétaux. Lorsque les populations de chenilles se développent de façon pléthorique des campagnes de lutte sont entreprises soit avec des moyens mécaniques (destruction des branches supportant les nids), soit par traitements aériens à l'aide d'insecticides. Le D.D.T. a d'abord été utilisé pour le traitement de grandes superficies mais en raison d'inconvénients majeurs tels que :

- apparition de phénomènes de résistance,
- nocivité pour la faune annexe,
- accumulation de résidus le long des chaînes alimentaires,

il a été abandonné au profit d'autres insecticides en particulier un organophosphoré : le malathion. —

Depuis quelques années, les produits chimiques non sélectifs tendent à être supplantés par les insecticides biologiques à base de *Bacillus thuringiensis* BERLINER, germe dont l'utilisation contre les chenilles processionnaires a été proposée depuis longtemps (GRISON et Coll. 1954, 1965 ; MARTOURET et MILAIRE, 1963). Avant que les formulations à base de ce bacille soient utilisées à grande échelle sur les pinèdes du littoral, il convenait de s'assurer que leur dispersion était sans aucun danger pour la faune marine et ne risquait en rien de contrarier l'activité des zones conchylicoles voisines. Pour ce faire nous avons déterminé, au laboratoire, la nocivité vis-à-vis d'espèces choisies parmi des mollusques, des crustacés et des poissons d'une part, et la vitesse d'élimination de *B. thuringiensis* ingérés par l'huître d'autre part.

I. - *Bacillus thuringiensis*.

C'est une bactérie sporulée Gram positif qui fut découverte dès 1905, puis réisolée et décrite par BERLINER (1911, 1915) ; ses principales propriétés sont actuellement bien connues (ROGOFF et YOSTEN, 1969). Les préparations insecticides contiennent, outre les spores du bacille, son endotoxine « figurée » qui se présente sous la forme d'une inclusion protéique parasporale généralement appelée « cristal » (fig. 1). Ce dernier est responsable de la majeure partie du pouvoir pathogène de *B. thuringiensis* pour les Lépidoptères, qui se traduit essentiellement par une toxémie (DE BARJAC 1968, 1970). Solubilisé dans l'intestin des chenilles sous l'action d'un pH alcalin et de protéases du chyle (LECADET, 1965), le cristal provoque alors une paralysie générale ou digestive entraînant rapidement la mort. Un grand nombre d'essais toxicologiques résumés par MARTOURET (1967) ont démontré l'innocuité des spores et des cristaux pour les vertébrés.

(1) Service de lutte biologique contre les insectes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, 75015 PARIS.

Les formulations commerciales (Bactospéine, Dipel, Thuricide etc.) sont généralement présentées sous forme de granulés ou de poudres mouillables. Leur activité insecticide est estimée comparativement à celle d'une préparation étalon E 61 de l'Institut Pasteur et exprimée en Unités Toxicologiques par rapport à tel ou tel autre insecte test : la plupart du temps en France *Anagasta kuhniella* ZELL. Les traitements aériens contre les chenilles processionnaires du pin sont pratiqués pen-

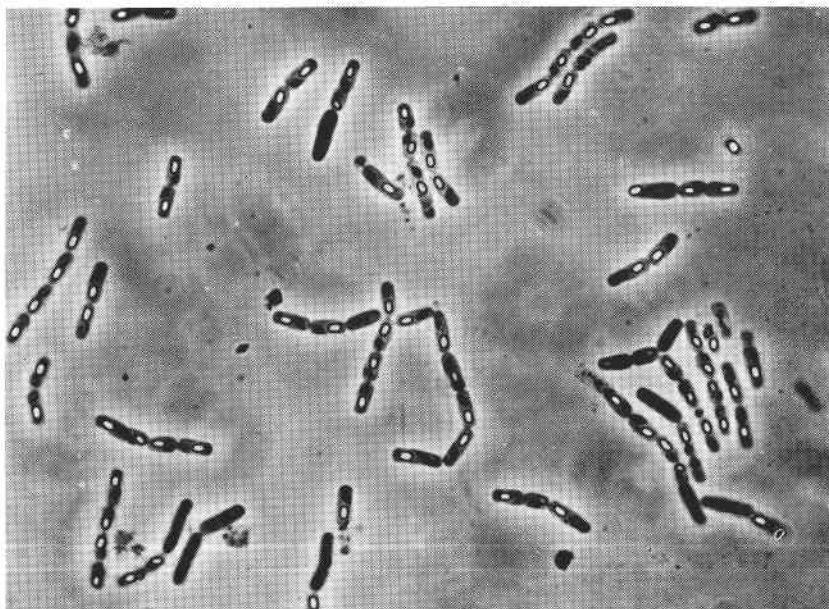


FIG. 1. — Examen de *B. thuringiensis* au microscope en contraste de phase montrant les spores et les cristaux inclus.

dant les mois de septembre et octobre à doses variant entre 0,5 et 1 kg à l'hectare de formulation titrant par exemple 16 000 unités par milligramme sur *Trichoplusia ni*.

II. - Expérimentations et résultats.

a) Toxicité aiguë.

Au cours de ces essais nous avons testé la résistance des animaux suivants :

- 2 Mollusques bivalves : *Mitylus edulis* (moule) ;
Crassostrea gigas (huître) ;
- 1 Mollusque gastéropode : *Littorina littorea* (bigorneau) ;
- 2 Crustacés : *Artemia salina* (artémie) ;
Crangon crangon (crevette grise) ;
- 1 Poisson : civelles d'*Anguilla anguilla*.

Nous avons utilisé des individus adultes provenant d'établissements conchylicoles (mollusques), de la pêche artisanale à l'embouchure de la Loire (crevettes et civelles) ou d'élevage de laboratoire (artémies).

L'expérimentation a été conduite sur des lots de 14 animaux : les artémies ont été nourries avec des cultures phytoplanctoniques et les crevettes grises avec des artémies adultes. Les mortalités ont été déterminées après 48 et 96 heures d'immersion dans des suspensions de 0, 10, 25, 50, 100, 200 et 400 mg de poudre mouillable (Dipel à 16 000 unités par mg) par litre d'eau de mer.

Afin de dissocier l'influence des particules insolubles, maintenues en suspension par le système d'aération de l'aquarium, les observations ont été également effectuées aux mêmes concentrations, mais après filtration sur papier de porosité élevée (filtre Durieux n° 127).

Les taux de mortalité enregistrés au bout de 48 et 96 heures d'immersion à la concentration la plus élevée sont rassemblés dans le tableau 1.

A l'issue du test, les lots de moules, huîtres et bigorneaux ont été placés, pendant 77 jours, en eau de mer propre régulièrement renouvelée, et nourris avec des cultures phytoplanctoniques : aucune mortalité anormale n'a été enregistrée pendant cette période.

L'examen des résultats montre que *Artemia salina* paraît être l'organisme le plus sensible à la présence de Dipel, puisque les doses létales 50 % calculées au bout de 48 et 96 heures sont respectivement de 85 et 65 mg/l. Cependant cette mortalité ne semble pas imputable à *B. thuringiensis* lui-même mais plutôt à un effet mécanique de la fraction insoluble de la formulation. Cette hypothèse

Concentration	% mort.	Huîtres	Moules	Bigorneaux	Artémies	Crevettes	Civelles
Dipel 400 mg/l	48 H	0	28,6 (1)	0 (3)	70	0	0
	96 H	0	28,6 (1)	0 (3)	90	0	10
Filtrat de Dipel à 400 mg/l	48 H	0	0 (2)	0 (3)	0	0	0
	96 H	0	0 (2)	0 (3)	10	0	0

(1) 50 % d'individus fixés au bout de 96 heures
 (2) 86 % d'individus fixés au bout de 96 heures
 (3) 100 % d'individus actifs au bout de 96 heures

TABLE. 1. — Taux de mortalité en présence de 400 mg/l de Dipel.

est confirmée par l'innocuité du filtrat. En ce qui concerne les crevettes, animaux de plus grande taille et qui sont moins actifs que les artémies, la suspension et le filtrat sont sans effet à la dose de 400 mg/l. Chez les mollusques, les moules sont les plus sensibles : l'activité dans un filtrat à 400 mg/l est réduite chez 14 % des individus qui perdent leur aptitude à la fixation.

En conclusion, il semble que des concentrations extrêmement élevées de Dipel n'ont qu'un effet limité sur les espèces que nous avons testées.

b) Action de doses sublétales sur l'huître.

La survie des coquillages de culture n'étant pas affectée par des concentrations élevées de Dipel, il convenait de s'assurer aussi que leur physiologie n'était pas perturbée. Parmi les différentes fonctions dont il est possible de mesurer le taux d'activité, nous avons choisi d'étudier l'influence de cet insecticide sur l'activité valvaire des huîtres. En effet, l'on sait qu'en présence de certains polluants (détergents, pesticides, résidus industriels...) les bivalves réagissent soit en accélérant considérablement le rythme d'ouverture-fermeture des valves, soit en s'isolant complètement du milieu, se soustrayant ainsi à l'action du toxique.

L'enregistrement de l'activité valvaire d'huîtres *Crassostrea gigas* élevées en baie de Bourgneuf et choisies parmi un lot homogène a été réalisé suivant la technique habituelle (ALZIEU, 1972). L'activité valvaire à 14 °C d'un échantillonnage d'huîtres a été enregistrée pendant 48 heures en eau de mer non contaminée. Ce premier test a permis de sélectionner dix individus qui furent répartis en deux lots égaux afin de déterminer leur activité valvaire en présence de 100 et 200 mg/l de Dipel.

Les taux d'ouverture des valves en milieu témoin et contaminé, ainsi que leur rapport sont donnés pour chaque individu dans le tableau 2. Une valeur moyenne de ces paramètres a également été calculée pour chaque lot.

L'analyse des résultats chiffrés montre que, aux concentrations étudiées, le Dipel n'a pas d'effet significatif sur l'activité valvaire des huîtres testées. Ces conclusions sont confirmées par un examen qualitatif des divers enregistrements réalisés qui ne font pas apparaître de modification ou de perturbation dans le rythme d'ouverture des valves. Il peut être intéressant de comparer les relations doses-effets dues au Dipel avec celles obtenues sur d'autres polluants. Une étude sur la nocivité des produits antipétrole a démontré que, pour des doses dix à vingt fois inférieures à celles utilisées, la majorité de ces produits réduisaient de 50 % ($a/b = 2$) l'activité valvaire de l'huître (ALZIEU, 1972). Ultérieurement, MAGGI (1973) a trouvé que deux insecticides organophosphorés, l'abate et le fénitrothion, inhibaient l'activité valvaire aux concentrations respectives de 10 et 5 mg/l.

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	moyenne
% d'ouverture											
témoin (a)	67,6	65,8	47,1	64,8	45,4	45,0	47,8	33,5	77,4	38,2	53,3
100 ppm (b)	75,3	58,8	51,1	53,2	53,2						58,3
200 ppm (c)						55,7	70,6	48,6	27,7	71,1	54,7
Rapport $\frac{a}{b}$	0,89	1,12	0,92	1,22	0,85						1,00
Rapport $\frac{a}{c}$						0,81	0,68	0,69	2,79	0,54	1,10

TABL. 2. — *Activité valvaire des huîtres en présence de 100 et 200 mg/l de Dipel.*

On peut donc considérer comme négligeable sur l'activité valvaire des huîtres l'action à court terme du Dipel aux concentrations testées. Il est important de remarquer que ces dernières sont très nettement supérieures à la dose d'utilisation lors d'épandages aériens.

c) *Élimination de Bacillus thuringiensis chez des huîtres artificiellement contaminées.*

Les bivalves filtreurs sont réputés pour leur aptitude à concentrer les germes présents dans les eaux polluées, puis à les éliminer quand le milieu redevient salubre. Dans l'hypothèse où une partie des produits de traitement serait entraînée accidentellement vers les zones conchylicoles, il importe de connaître le devenir des spores de *B. thuringiensis*. Il nous a donc paru intéressant de contaminer massivement des huîtres par séjour, à divers temps, en eau de mer additionnée de Dipel, puis de suivre la richesse de ces huîtres en *B. thuringiensis* au fur et à mesure de leur épuration naturelle en eau de mer non polluée.

Méthodes.

Des lots de jeunes huîtres (18 mois) *Crassostrea gigas* ont été immergés pendant 24, 48, 72 et 96 heures dans 20 litres d'eau de mer contenant 20 mg/l de Dipel. Cette concentration correspond théoriquement à celle de l'eau d'une claire de 0,50 m de profondeur après un traitement aérien à la dose de 100 kg/ha alors que le traitement normal est de 1 kg/ha.

La température de l'eau a été maintenue à $18^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$, et les mollusques n'ont reçu aucune alimentation pendant cette période; le lot témoin a été isolé dans une autre salle d'expérience de façon à limiter les risques de contamination secondaire par aérosol. Après leur séjour en milieu

contaminé, les huîtres ont été maintenues pendant dix jours en eau de mer propre additionnée de cultures phytoplanctoniques et renouvelée deux fois par jour. Des prélèvements ont été effectués à la fin de l'immersion et après 1, 2, 3, 4, 7 et 10 jours en milieu propre. La chair égouttée de chaque huître a été finement broyée avec un « ultraturax » à 20 000 tours par minute pendant 45 secondes.

Les numérations des germes viables ont été effectuées en boîtes de « Bacto nutrient agar » (Difco)ensemencées par des dilutions en eau physiologique de 10^{-1} à 10^{-4} des broyats de chaque huître, préalablement tous amenés à un même volume de 4 ml. Chaque dilution est inoculée, en six exemplaires, en tubes de gélose molle (Difco) à 7 % maintenus à 45° C, à raison de 0,1 ml de dilution pour 3 ml de milieu. Après homogénéisation au Vortex, le contenu de chaque tube est coulé à la surface d'une boîte de Pétri contenant le Bacto nutrient agar. Le comptage se fait au bout de

Durée de l'épuration en jours	Durée de la contamination en heures							
	24		48		72		96	
	numération	%	numération	%	numération	%	numération	%
0	15 164	0	18 242	0	21 454	0	30 249	0
1	2 199	85,5	12 166	33,4	18 577	13,5	25 088	17,1
2	1 860	87,8	3 932	78,5	8 338	61,2	20 998	30,6
3	949	93,7	5 888	67,8	9 743	54,6	6 960	77
4	954	93,7	2 149	88,3	8 010	62,7	6 588	78,3
7	716	95,3	682	96,3	6 232	71	4 410	85,5
10	577	96,8	745	96	4 883	77,3	5 587	81,6

TABLE. 3. — *Richesse des huîtres en B. thuringiensis en fonction des durées de contamination et d'épuration.* Les numérations indiquent le nombre de bactéries viables par millilitre de broyat (4 ml) et les pourcentages, le taux d'élimination par rapport au nombre de germes présents au début de l'épuration.

44 h d'incubation à 30° C. Dans ces conditions, la morphologie typique des colonies de *B. thuringiensis* permet de les reconnaître très facilement et de les distinguer des autres germes relativement rares qui peuvent co-cultiver. En outre, une centaine de contrôles ont été pratiqués par recherche microscopique des spores et des cristaux. L'agglutination flagellaire a été appliquée dans une trentaine de cas, pour vérifier le sérotype 3 de la souche en question.

Cette technique a été choisie comme étant celle donnant les meilleurs résultats au cours d'essais préliminaires comparatifs faits en variant les conditions de milieu et d'inoculum. D'après ces essais, nous n'avons pas retenu le chauffage des dilutions à 80° C pendant 12 minutes, ce traitement diminuant les résultats au minimum de la moitié, soit à cause de la germination des spores, soit à cause d'une modification physico-chimique du milieu.

Résultats.

Trois séries d'expériences ont été pratiquées sur un total de 144 huîtres. Le tableau 3 donne les résultats d'une série complète, où la richesse en *B. thuringiensis* est suivie sur quatre lots d'huîtres immergés en présence de Dipel pendant 1 à 4 jours, puis transférés durant dix jours en eau de mer pure. Les numérations ont été effectuées avant et après cette épuration, pendant un à dix jours. Des témoins ont été faits simultanément. Les chiffres indiqués représentent les moyennes des six numérations faites sur les trois huîtres de chaque lot.

Il faut signaler la grande variabilité des résultats obtenus pour les huîtres d'un même lot, ce qui doit être vraisemblablement dû à l'activité propre de chaque individu qui l'amène à filtrer un volume d'eau différent.

Ces chiffres n'ont donc qu'une valeur relative et peuvent varier fortement suivant les individus testés. Par exemple, au cours d'une autre série d'expériences, les moyennes des taux de *B. thuringiensis* avant épuration étaient après 2 jours de contamination de 19 452, après 3 jours de 53 068 et après 4 jours de 95 443/ml.

Le tableau 3, représenté sur la figure 2, montre bien les variations de la vitesse d'épuration en fonction du degré de contamination. On peut ainsi constater que l'épuration du lot contaminé pendant 24 h est pratiquement réalisée en 2 jours. Dès le 1^{er} jour, cette épuration atteint 85,5 % pour passer à 93,7 % au 3^e jour. Les résultats des 7^e et 10^e jours sont comparables à ceux donnés par les témoins dont les moyennes vont de 133 à 666/ml, ce qui fait qu'un pourcentage d'épuration de 95 à 96 % peut être considéré comme satisfaisant.

L'épuration du lot contaminé durant 48 h demande 4 jours au lieu de 2 pour atteindre le même taux, mais au 7^e jour, elle est de 96 % comme précédemment. L'épuration du lot contaminé pendant 72 h est encore plus lente. Très faible le 1^{er} jour, elle reste aux alentours de 60 % du 2^e au 4^e jour, et varie peu du 7^e au 10^e où elle atteint finalement 77,3 %. Enfin, l'épuration du lot contaminé pendant 96 h est la plus lente au 2^e jour, avec un taux de 30,6 %, mais elle aboutit au 10^e à 81,6 %.

L'influence du temps de contamination est donc très nette. L'allongement de ce temps semble provoquer une diminution des facultés d'épuration des huîtres, ce qui se traduit non seulement par un ralentissement de l'épuration, mais aussi, à partir de 72 h, par un blocage de cette épuration qui reste toujours inférieure à 95 % au bout de 10 jours.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux de FAUVEL (1967) qui obtient des courbes d'allure comparable en étudiant l'épuration de palourdes contaminées par *E. coli*. Il est particulièrement rassurant d'avoir pu constater qu'une contamination massive d'huîtres par *B. thuringiensis* se résolvait rapidement en eau propre, à condition que le temps de contact avec les bactéries n'excède pas 48 h. De plus, au cours d'infections expérimentales beaucoup plus sévères par injection intracardiaque chez des huîtres *Crassostrea virginica*, FENG (1966) a trouvé que les cellules végétatives étaient presque complètement phagocytées au bout de 24 h sans manifestations pathologiques. Tous ces faits sont à mettre à l'avantage de l'utilisation des préparations insecticides à base de *B. thuringiensis*.

Conclusions.

L'ensemble de ces essais montre que le Dipel n'a qu'une action très limitée sur la faune marine : la vie des mollusques de culture n'étant pas affectée par la présence de quantités élevées de produit. Par contre, un de nos crustacés de référence *Artemia salina* semble plus vulnérable. Cependant, les concentrations nécessaires pour atteindre les doses létales 50 % sont 300 à 400 fois plus élevées que celles obtenues dans une claire profonde de 0,50 m traitée accidentellement à la dose de 1 kg par hectare.

Comparée à celle du DDT, insecticide de synthèse longtemps utilisé pour la lutte contre la chenille processionnaire du pin, la toxicité du produit qui nous a été soumis est environ 1 000 fois

moindre pour les crustacés, alors que les mollusques peuvent supporter des concentrations correspondant à 10 000 fois la DL_{50} du DDT chez ces mêmes organismes. On peut considérer que les quantités de *B. thuringiensis* qui pourraient être introduites dans les bassins conchylicoles, ne devraient pas avoir d'effets sur la biologie des mollusques étant donné que :

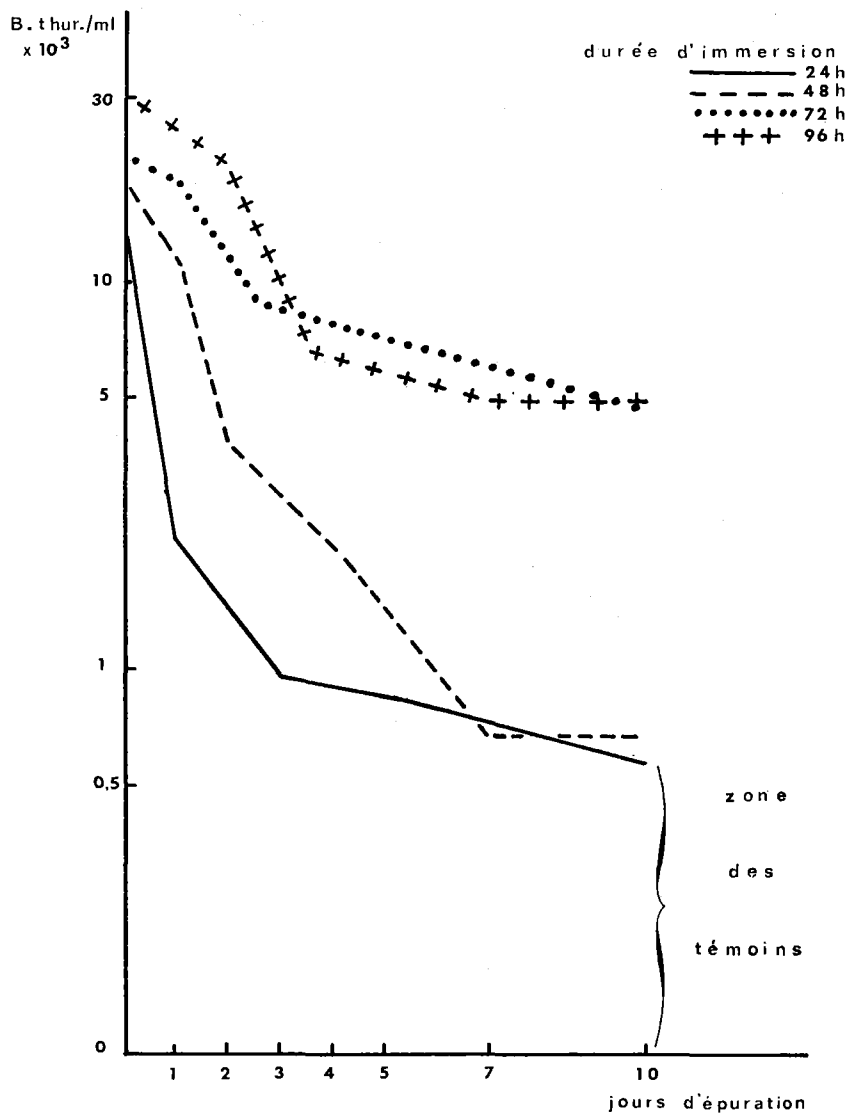


FIG. 2. — Vitesse d'épuration en fonction du degré de contamination.

les zones maritimes immergées (bassins, claires, étangs) ne font pas l'objet de traitements directs,

le seuil de toxicité aiguë pour les huîtres et les moules est 2 000 fois plus élevé que la concentration théorique résultant du traitement accidentel d'une zone marine fermée,

l'élimination de *B. thuringiensis* par l'huître est rapide quand la contamination est faible.

Il semble donc que, en raison de la tolérance des espèces marines à *B. thuringiensis*, les formulations du type de celle que nous avons testée puissent être utilisées pour le traitement des forêts en zone littorale. Cependant toutes les précautions devront être prises pour qu'aucun écoulement accidentel massif de produit ne parvienne directement à la mer.

BIBLIOGRAPHIE

- ALZIEU (Cl.), 1972. — Toxicité relative de produits antipétrole sur deux organismes marins. — *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **36** (1), p. 103-119.
- BARJAC (H. de), 1968. — Les toxines de *B. thuringiensis*. — *Rev. Pathol. Comparée*, 5-2-795, p. 89-94.
— 1970. — Insecticides et Lutte biologique : Un cas particulier ; celui de *B. thuringiensis*. — *Documents*, **4**, p. 17-21.
- BERLINER (E.), 1911. — Ueber die Schlagsucht der Mehlmotten-raupe. — *Z. Ges. Getreidew.*, **3**, p. 63-70.
— 1915. — Ueber die Schlagsucht der Mehlmetten-raupe (*Ephestia Kuhnii* ZELL.) und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis* n. sp. — *Z. Angew. Entomol.*, **2**, p. 29-56.
- FAUVEL (Y.), 1967. — La pollution bactérienne des eaux et des coquillages de l'étang de Thau. — *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **31** (1), p. 9-94.
- FENG (S.U.), 1966. — Experimental bacterial infections in the oyster *Crassostrea virginica*. — *J. Invert. Pathology*, **8**, p. 505-511.
- GRISON (P.) et BEGUIN (S.), 1954. — Premiers essais sur une méthode d'emploi et sur l'efficacité de *Bacillus cereus* contre les chenilles processionnaires. — *C. R. Acad. Agric., France*, **40**, p. 413-416.
- GRISON (P.), MARTOURET (D.) et SERVAIS (B.), 1965. — Lutte microbiologique avec *Bacillus thuringiensis* BERLINER contre la processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa*-SCHIFF) et modalités de la distribution des germes. — *C. R. Acad. Agric., France*, p. 117-123.
- LECADET (M.-M.), 1965. — Isolement et caractérisation de deux protéases des chenilles de *Pieris brassicae* L. et étude de leur action sur l'inclusion parasporale de *Bacillus thuringiensis*. — Thèse Doct. et Sciences, Paris.
- MAGGI (P.), 1973. — Toxicité relative de deux insecticides organo-phosphorés : l'abate et le fénitrothion. — *Rev. Trav. Inst. Pêches Marit.*, **37** (1), p. 137-144.
- MARTOURET (D.), 1967. — Etat de nos connaissances sur l'activité des toxines de *Bacillus thuringiensis* sur les vertèbres. — *Phytratrie, Phytopharmacie*, **16**, p. 75-82.
- MARTOURET (D.) et MILAIRE (H.), 1963. — Expérimentation de produits bactériens à base de *Bacillus thuringiensis* à l'échelon agricole. — *Phytratrie, Phytopharmacie*, **12**, p. 71-80.
- ROGOFF (M.-H.) et YOUSSTEN (A.-A.), 1969. — *Bacillus thuringiensis* : Microbiological considerations. — *Ann. Rev. Microbiol.*, **23**, p. 357-386.